

2016 年度 修士論文要旨

MCM 結合タンパク Mcb1 の精製および結晶化

関西学院大学大学院理工学研究科

化学専攻 山口研究室 三田 雄也

【序論】真核生物の複製ヘリカーゼは Mcm2 から 7 の 6 つのタンパク質からなり、MCM 複合体と呼ばれる。これらは 6 つの構成サブユニット中央部分にヘリカーゼ活性を担っており、複製フォークの安定化に関与する等、DNA 複製に必要不可欠である。MCM 複合体の結合因子である MCM-BP(MCM-binding protein)がヒト細胞で同定され、そのオルソログとして Mcb1(MCM-binding protein 1)が分裂酵母において同定された。Mcb1 は Mcm2 以外の Mcm3 から 7 と相互作用することが報告されており、過剰発現させると Mcm2 と他の MCM タンパク質複合体の結合が解離するため、DNA の過剰複製を制御していると考えられている。このことは真核生物全般に当てはまるとされている。しかし、Mcb1 の未解明な点として MCM 複合体との結合様式、細胞内での広範囲の分布の理由等が挙げられる。

そこで今回は、生化学的手法とは異なる構造学的手法で Mcb1 の立体構造を原子レベルで解明することを目的とし、構造解析を行うべく、精製条件の検討、結晶化に着手した。

【実験・結果】目的タンパク質発現系として His6 タグ、T7 タグを付加した Mcb1 を pET28a に挿入した発現プラスミド(pKT2266)、宿主大腸菌として Nico21(DE3)を用いた。形質転換した大腸菌をカナマイシン入りの培地に 8 L スケールで OD600 \approx 0.6 まで 37 °C で振盪培養し、終濃度 0.1 mM となるようにイソプロピル- β -チオガラクトピラノシド(IPTG)を加え、16 °C で本培養を 16 時間行った。集菌後、Lysis Buffer に還元剤として β -Mercaptoethanol、プロテアーゼ阻害剤として phenyl methyl sulfonyl Fluoride(PMSF)を、それぞれの終濃度が 10, 1 mM となるよう加えた。上記 Lysis Buffer を用いて懸濁を行った後、超音波破碎機で菌体を破碎後(10 min, 600,000 J, on-off: 1 sec)、遠心分離(4 °C, 12,000 rpm, 15 min)を行い、上清を回収した。残った沈殿を上記と同じ条件でもう一度超音波処理し上清を回収した。次に、高純度の His6-tagged Mcb1 を得るために、Ni-NTA 樹脂を用いて目的タンパク質を吸着させ、イミダゾール濃度の違いを利用し、目的タンパク質を溶出させた。その後、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて、His6-tagged Mcb1 の精製を行った。目的タンパク質の評価は SDS-8%PAGE、動的光散乱法により行った。

先行実験から、イミダゾール濃度 70 mM の洗浄画分から 70~75 kDa の不純物が多く確認されていたため、本実験では 5 カラム体積相当の 100 ml で洗浄し、10 ml 毎に分取し、イミダゾール濃度との関係を検証するため SDS-8%PAGE による評価を行った。その結果、目的タンパク質の分子量 56 kDa 付近に殆どバンドが確認されず、主に 70 kDa 付近にバンドが多く確認されたため、これまでの粗精製では不十分であったことが確認できた。

溶出画分として 100 mM イミダゾールを含む緩衝液で洗浄と同様、5 カラム体積で溶出を行い、10 ml 毎に分取し SDS-8%PAGE, 動的散乱法による評価を行った結果、SDS-8%PAGE においては目的タンパク質の分子量と考えられる 56kDa 付近に単一のバンドが確認され、動的散乱法においては結晶化に適したサンプルであるとされる多分散指数 0.02 を下回っていた。

粗精製を行った画分を限外ろ過膜により約 2 ml まで濃縮し、その後ゲルろ過クロマトグラフィーカラムにより、ゲルろ過を行った。精製画分を SDS-8%PAGE により評価を行い、動的散乱法による評価を行ったが、多分散指数は 0.107 であり結晶化に適した多分散指数 0.02 を下回っていた。

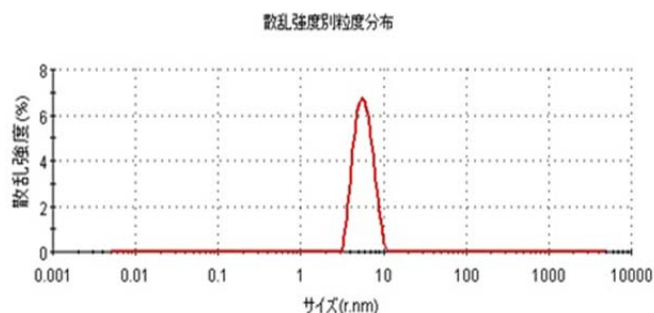


図 1 精製画分における粒径分布

先行研究では、酸化型、還元型グルタチオンを用いてリフォールディングを行い、不純物、非特異的結合タンパク質を除去する試みが行われてきたが、CD スペクトルの結果から構造を保つことが困難であると示唆されている。多分散指数は下がらなかったが本条件で結晶化を行うこととした。

結晶化条件の検討には市販のスクリーニングキット Wizard □, □ (Emerald BioSystems) を用いて計 96 条件を行った。リザーバー溶液は 80 μ l を用い、ドロップはタンパク質溶液 0.2 μ l とリザーバー溶液 0.2 μ l を混合した。

シッティングドロップ法を用いて結晶化を試みた結果、20 % PEG1000(ポリエチレングリコール), 100 mM Sodium acetate/Acetic acid pH 4.5, 200 mM Zinc acetate のリザーバー溶液において、図 2 に示した結晶が生じた。紫外光を当てた結果、僅かに光っておりタンパク質の結晶である可能性が高いことが示唆された。



図 2 Mcb1 の結晶

今回は 1 条件のみで結晶が得られ、再現性の実験は未だ行うことができていない。結晶を分離して X 線回折実験を行い、タンパク質結晶であるかどうかの確認や格子定数などの結晶学的データの決定も可能だと考えられる。しかしながら、結晶化の再現性が悪い場合、現在得られている結晶で全データ収集などを行わなければならない、放射光の稼働時期まで結晶を温存する必要がある。もしくは、本結晶を破砕して結晶の核として用いることも考えられ、まずは結晶化の再現性実験が優先すると考えている。